



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**Департман за фитомедицину и заштиту
животне средине**



Ксенија Увалић

дипл. инж. пољопривреде

**ЕФЕКТИ ИЗОЛАТА *Trichoderma harzianum* У СУЗБИЈАЊУ
УГЉЕНАСТЕ ТРУЛЕЖИ КОРЕНА ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ
МАСТЕР РАД**

Нови Сад, 2021.



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**Департман за фитомедицину и заштиту
животне средине**



Кандидат
Ксенија Увалић

Ментор
Др Драгана Будаков

**ЕФЕКТИ ИЗОЛАТА *Trichoderma harzianum* У СУЗБИЈАЊУ
УГЉЕНАСТЕ ТРУЛЕЖИ КОРЕНА ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ
МАСТЕР РАД**

Нови Сад, 2021.

ЕФЕКТИ ИЗОЛАТА *Trichoderma harzianum* У СУЗБИЈАЊУ УГЉЕНАСТЕ ТРУЛЕЖИ КОРЕНА ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ

Ксенија Увалић

Резиме

Угљенаста трулеж корена шећерне репе у Европи све чешће наноси велике штете у усевима како шећерне репе, тако и других биљних врста. Штете се огледају у смањењу приноса и квалитета корена. Најинтензивнија активност патогена *Macrophomina phaseolina* одвија се у сушним периодима, када биљке услед недостатка воде губе виталност и постају осетљиве према проузроковачима болести. Проблем са *Macrophomina phaseolina* јавља се из тог разлога што је овај проузроковач земљишни микроорганизам и што, код нас, за његово сузбијање не постоје комецијално доступни хемијски препарати.

У истраживању ће бити проучавана два изолата гљиве *Trichoderma harzianum* за које се сматра да би могли да имају високу ефикасност у сузбијању овог патогена. Резултати овог рада представљају значајан допринос решавању горућег проблема са проузроковачем угљенасте трулежи корена шећерне репе.

Кључне речи: *Macrophomina phaseolina*, *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* T2, *T. harzianum* T12, шећерна репа, угљенаста трулеж, биолошка контрола

EFFECTS OF *Trichoderma harzianum* ISOLATES IN SUGAR BEET CHARCOAL ROOT ROT MANAGEMENT

Ksenija Uvalić

Summary

Coal rot of sugar beet roots in Europe is increasingly causing great damage to crops of both sugar beet and other plant species. The damage is reflected in reduction of yield and root quality. The most intensive activity of the pathogen *Macrophomina phaseolina* takes place in dry periods, when plants lose vitality due to lack of water and become sensitive to pathogens. The problem with *Macrophomina phaseolina* occurs for the reason that this causative agent is a soil microorganism and that, in our country, there are no commercially available chemical preparations for its suppression.

The study will study two isolates of the fungus *Trichoderma harzianum*, which are thought to be effective against this pathogen. Results of this work will contribute to solving the burning problem with the charcoal root rot of sugar beet.

Key words: *Macrophomina phaseolina*, *Trichoderma harzianum*, *T. harzianum* T2, *T. harzianum* T12, sugar beet, charcoal root rot, biological control

Чланови комисије за оцену и одбрану мастер рада

Др Драгана Будаков, ванредни професор,
Ужа научна област Фитопатологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад
Ментор

Др Мила Граховац, ванредни професор,
Ужа научна област Фитопатологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад

Др Јована Граховац, ванредни професор,
ужа научна област биотехнологија и
фармацеутско инжењерство,
Технолошки факултет, Нови Сад

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. ЗНАЧАЈ ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ	3
2.2. ПРОИЗВОДЊА ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ.....	5
2.3. БОЛЕСТИ ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ	6
2.4. УГЉЕНАСТА ТРУЛЕЖ БИЉАКА	7
Проузроковач: <i>Macrophomina phaseolina</i>	7
2.4.1. Штете и губици	9
2.4.2. Мере заштите.....	9
2.5. БИОПЕСТИЦИДИ.....	10
2.5.1. Биофунгициди	12
2.5.2. <i>Trichoderma spp.</i>	13
2.5.3. <i>Bacillus spp.</i>	17
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА	19
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА	20
4.1. САДЊА И ГАЈЕЊЕ БИЉАКА ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ.....	20
4.2. ПРИПРЕМА ИНОКУЛУМА	21
4.3. ПРИПРЕМА БИОАГЕНСА	21
4.4. ДИЗАЈН ОГЛЕДА.....	22
4.5. ОЦЕНА СИМПТОМА ОБОЉЕЊА.....	24
4.6. АНАЛИЗА ПОДАТАКА	25
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА.....	26
5.1. ОЦЕНА СИМПТОМА ОБОЉЕЊА.....	26
5.1.1. Симптоми болести на биљкама шећерне репе	26
6. ЗАКЉУЧАК.....	31
7. ЛИТЕРАТУРА.....	33

1. УВОД

Шећерна репа се сматра „краљицом усева“ због високих захтева када је у питању њен узгој. Број патогена који нападају ову индустријску биљку је велики, те је самим тим заштита неизоставан фактор који утиче на висину приноса и квалитет корена. Уколико се технолошке операције, у виду обраде земљишта, прихране, заштите, не изврше у право време, последице могу резултирати смањењем приноса и квалитета шећерне репе (Rešić, 2008; Tot, 2008).

У последњој деценији у Европи забележене су значајније промене климатских фактора. Током последњих скоро 100 година забележен је пораст температуре површинског ваздуха за 0,9°C на нивоу целог континента, при чему је пораст температуре ваздуха у последњих 25 година најзначајнији у централној и североисточној Европи. Када је реч о падавинама, примећене су учесталије појаве сушних периода током пролећа и почетком лета (Olensen и сар., 2011).

Управо патогену *Macrophomina phaseolina*, проузроковачу угљенасте трулежи, погодују новонастале климатске промене као што су недостатак влаге и високе температуре земљишта. *M. phaseolina* је доминантни проузроковач трулежи корена на шећерној репи у нашим агроеколошким условима, при чему се њена масовна појава одвија у јулу и августу месецу, када биљке почињу да губе виталност услед стреса проузрокованог високим температурама и недостатком воде (Балаж и сар. 2010).

Сузбијање проузроковача угљенасте трулежи корена шећерне репе није лако решив проблем. С обзиром на то да се овај патоген одржава у земљишту, борба с њим представља изазов. У Републици Србији нема регистрованих синтетичких препарата који би се користили у сузбијању угљенасте трулежи. И када би их било, врло је вероватно да би довели до нарушавања земљишне микрофлоре, те се сматра да је њихова примена не само неефикасна, већ и носи висок ризик од загађења зељишта, подземних вода и других ресурса животне средине. Фунгициди који се користе за третирање семена имају краткотрајан ефекат у почетним фазама развоја, а уколико се у заштити константно користе фунгициди на бази истих активних материја, постоји ризик од појаве резистентности. Из наведених разлога, предност се све више даје биолошкој контроли патогена (Anis и сар. 2010).

Биолошка заштита биљака представља примену корисних микроорганизама, биљака и њихових екстраката у циљу сузбијања патогена, проузроковача болести биљака. Предност примене биопестицида је у томе што се њиховом применом смањује негативни утицај на животну средину и здравље људи, доприноси се развоју одрживе пољопривредне производње и овакве супстанце су погодне за примену у заштити биљака у органској производњи (Grahovac и сар., 2009).

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. ЗНАЧАЈ ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ

Шећерна репа (*Beta vulgaris*) је биљна врста која, поред шећерне трске, представља најважнију сировину за производњу шећера. Када се говори о подручју Европе, слободно се може рећи да има прворазредни значај који се пореди са значајем пшенице и кукуруза. Од производње шећерне репе зависе и многе друге гране индустрије, а нарочито прехранбена индустрија. Припада породици *Chenopodiaceae*, роду *Beta*. Двогодишња је биљка, те у првој години ствара корен са нагомиланим хранљивим материјама и лисну розету, док у другој години вегетације образује цветно стабло, цвет и плод. Шећерна репа (Слика 1.) води порекло од дивљих врста биљака из рода *Beta*, од којих је у Византији била узгајана коренска репа, а у западној Европи лисната. Њиховом спонтаном хибридизацијом дошло је до стварања родоначелника шећерне репе. Главни производ јесте шећер, а као пратећи производи јављају се листови са главама, репини резанци (користе се као сточна храна), меласа (користи се у производњи квасца и алкохолних пића) и сатурациони муљ (примењује се ради смањења киселости земљишта) (Todorović и Komljenović, 2003).



Слика 1. Шећерна репа (Фото: https://bonapeti.rs/n7-84971-%C5%A0e%C4%87erna_Repa)

Задебљали корен шећерне репе садржи између 14 и 20% шећера, при чему на хемијски састав шећерне репе утичу гајени хибриди и сорте, агротехничке мере, климатски и земљишни услови (Todorović и Komljenović, 2003; Važok и сар., 2015). Приликом производње шећерне репе све агротехничке мере имају једнако важну улогу у приносу и квалитету. Ипак, висина приноса је у директној зависности од агротехничке мере која је најлошије урађена (Marković и Zekić, 2011).

У периоду између 2000. и 2011. године, површине на којима се узгаја шећерна репа у свету су смањене за око половину. Између 2006. и 2010. године површина на којој је узгајана шећерна репа на светском нивоу износила је 4.761.242 ha. Европа, као водећи континент, на годишњем нивоу произведе око 70% од укупне количине, при чему у највеће произвођаче спадају Француска, Италија, Немачка и Пољска. Између шездесетих и осамдесетих година прошлог века Војводина је, у погледу просечних приноса шећерне репе, била у рангу са данашњим водећим земљама. Пад укупних површина под овим усевом објашњава се чињеницом да је постигнут огроман напредак у оплемењивању, као и у техници гајења шећерне репе (Marković и Zekić, 2011; Važok и сар., 2015).

Према Marinković и Stobaras (2000) агроеколошки чиниоци и земљиште служе као основни оквир у биљној производњи, док обим производње одређују сорта или хибрид и технологија гајења. Сваки милиметар земље и свака година специфични су за себе, те је

потребно велико знање и искуство како би се сви елементи усагласили и прилагодили датим условима. Свако одступање од оптималног нивоа са собом носи негативан утицај на висину и квалитет приноса.

2.2. ПРОИЗВОДЊА ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ

Шећерна репа је у односу на захтеве према светлости мезофилна биљка, односно има средње захтеве према интензитету осветљења. Узгаја се у умереном климатском подручју од 30° до 60° северне географске ширине и 25° до 35° јужне географске ширине (Rešić, 2020).

Према подацима из 2019. године шећерна репа је узгајана на површини од 4,609,434 ha, при чему је просечан принос био око 60 t/ha. Водећа земља у производњи шећерне репе у свету је Русија са приносом од преко 54 милиона тона. Након Русије, земље које такође имају значајне приносе јесу Француска, Немачка, САД, Турска, Пољска, Кина, Египат, Украјина, Велика Британија (График 1.). Од укупних светских површина, око 70% се узгаја на подручју Европе (FAOStat).

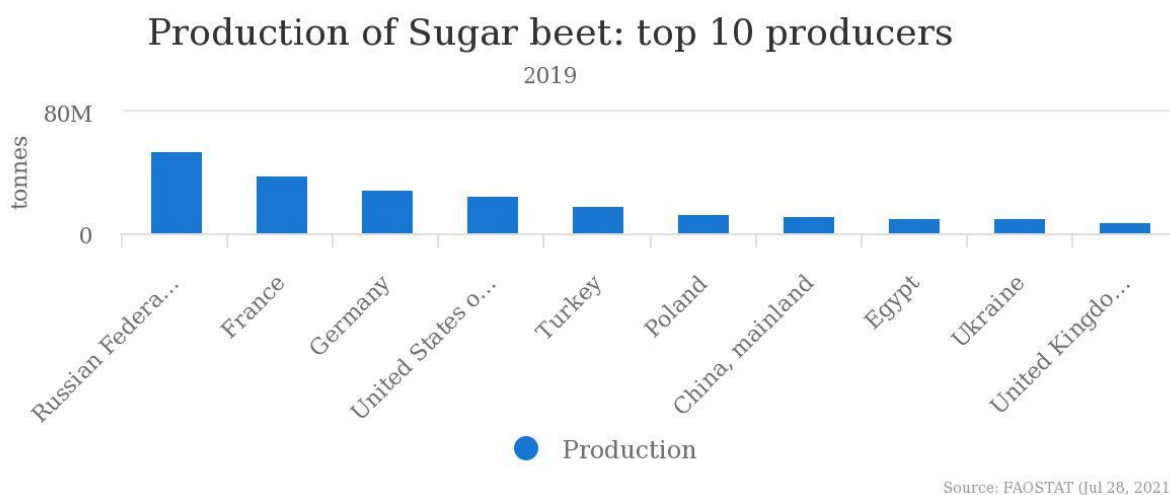


График 1. Производња шећерне репе по земљама

Извор: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

У Табели 1. дат је приказ петогодишњег пресека површина под шећерном репом у Републици Србији, као и њихов принос изражен у t/ha.

Табела 1. Производња шећерне репе у Републици Србији у периоду од 2016 - 2020. године

Шећерна репа			
Период	пожњевена површина, ha / родна површина, ha	укупан принос, t	принос, t/ha
2016	49237	2683860	54.4
2017	53857	2513495	46.7
2018	48125	2325303	48.3
2019	42539	2305316	54.2
2020	37418	2018215	53.9

Извор: <https://data.stat.gov.rs>

2.3. БОЛЕСТИ ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ

Као и све остале биљне врсте, тако и шећерна репа бива нападнута од стране многих штетних микроорганизама. Гљиве и псеудогљиве су њени најчешћи „непријатељи“ и оне су заслужне за највећи број болести проузрокованих на шећерној репи. Као најважнији проузроковач болести истиче се *Cercospora beticola* – проузроковач пегавости листа. Због великог садржаја хранљивих материја, корен представља примамљиву подлогу за развој многих гљива, псеудогљива и бактерија као што су *Rhizoctonia solani* (проузроковач смеђе трулежи), *Fusarium spp.*, *Macrophomina phaseolina* (проузроковач угљенасте трулежи биљака), *Arhanomyces cochlioides* (псеудогљива која проузрокује трулеж корена шећерне репе), *Agrobacterium tumefaciens* (проузроковач рака корена), *Phytophthora megasperma* (проузроковач влажне трулежи корена), *Ramularia beticola* (проузроковач сиве пегавости лишћа репе), *Fusarium oxysporum f.sp. betae* (проузроковач трулежи корена шећерне репе),

Peronospora schachtii (проузроковач пламењаче шећерне репе), *Polymixa betae* (вектор вируса „ризоманије“ репе) (Todorović i Komljenović, 2003; Rešić, 2020).

2.4. УГЉЕНАСТА ТРУЛЕЖ БИЉАКА

Проузроковач: *Macrophomina phaseolina*

Царство: *Fungi*

Раздео: *Ascomycota*

Подраздео: *Pezizomycotina*

Класа: *Dothideomycetes*

Ред: *Botryosphaerales*

Породица: *Botryosphaeriaceae*

Род: *Macrophomina* (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/32134>)

Проузроковач угљенасте трулежи корена (*Macrophomina phaseolina*) је веома распрострањен паразит у климатским подручјима у којима владају високе температуре са дужим периодима у којима нема падавина у току другог дела вегетације. Подручја у којима је овај паразит присутан јесу јужни делови бившег Совјетског Савеза, Пиринејско и Апенинско полуострво, Блиски и Средњи Исток, северна Африка и Јужна Америка. У последње време се много чешће јавља на површинама под усевом шећерне репе и причињава значајне штете (Konstantinović и сар., 2001; Balaž и сар., 2010).

Macrophomina phaseolina припада збирној групи *Deuteromycetes*. Овој групи припадају гљиве код којих су полно размножавање и полне структуре ретке, у неким случајевима их нема или још увек нису познате. Уколико дође до откривања полних стадијума, у зависности од плодноних органа које поседују, бивају смештене у разделе *Ascomycota* или *Basidiomycota*. Образују добро развијену, септирану и разгранату мицелију, а бесполне структуре (конидије) могу да образују слободно на конидиофорама или у

плодоносним структурама као што су ацервуле или пикниди. Гљива *Macrophomina phaseolina* припада групи гљива које формирају конидије (пикноспоре) у пикнидима (Stojšin и сар., 2008). Пикниди су тамне, округласте мицелијске творевине чији зидови настају преплитањем хифа. Са унутрашње стране зида образују се конидије (пикноспоре) на кратким конидиофорама и оне се разликују по форми, величини и броју ћелија. Ослобађање пикноспора одвија се кроз мали вршни отвор, при чему оне излазе у виду слузасте масе (Бабовић, 2003).

Први симптоми болести јављају се у виду губљења тургора лишћа. Биљке се не опорављају чак ни у ноћном периоду, те корен почиње да труне. Боја корена постаје сивомрка до црна, при чему добија сребрнасти одсјај и на корену се јављају ситне црне микросклероције које су јасан знак присуства овог паразита. Унутрашња ткива корена који је нападнут од стране овог патогена добијају сунђерасту конзистенцију, лимунжуте боје која на крају прелази у мркоцрно обојење. На крају вегетације, оболеле биљке се суше и потпуно угињавају (Konstantinović и сар., 2001; Balaž и сар., 2010).

Домаћини паразита су многе гајене биљке, као што су сунцокрет, соја, шећерна репа, кукуруз, сирак, пасуљ, грашак, паприка, кромпир, лук, купус и друге повртарске и коровске биљке. У зараженим биљним деловима формира ситне црне микросклероције, док пикниде ретко формира. Микросклероције настају анастомозирањем дебелизидних мицелијских ћелија. Уколико формира пикниде, они су тамномрки, појединачни или се налазе у групама и урођени су у биљно ткиво. У њима се налазе пикноспоре које су безбојне, елипсоидне и једноћелијске. Одржава се у земљишту у облику склероција које се у влажном земљишту одржавају свега 7 - 8 недеља. Након тога, оне бивају нападнуте од стране сапрофитних микроорганизама и из тог разлога им више погодују сува земљишта са температурама од 30° С и више. Склероције се преносе путем зараженог семена биљака, у земљишту клијају у мицелију и заражавају корен биљака. До инфекције младих биљака долази када паразит доспе на корен биљке, тада он продире у паренхим и улази у судовни систем корена. Путем спроводних судова, паразит долази до хипокотила и настањује приземни део стабла биљке, а касније се у условима недостатка влаге шири у биљци (Konstantinović и сар., 2001; Stojšin и сар., 2008; Balaž и сар., 2010).

2.4.1. Штете и губици

Када се говори о штетности и губицима које овај проузроковач може да нанесе, подаци нису занемарљиви. У Русији је забележено смањење приноса сунцокрета за 18 – 64%, док се у Венецуели опсег губитка кретао од 36,8 до чак 79,2%. Велики губитак на простору бивше Југославије забележен је 1961. године, када је смањење приноса сунцокрета износило од 25 – 50%, а смањење приноса соје се у сушним годинама кретало у просеку 20 – 25% (Balaž и сар., 2010).

2.4.2. Мере заштите

Обављање превентивних агротехничких мера је од великог значаја за сузбијање патогена. Избалансирано ђубрење, оптималан биљни склоп и наводњавање утичу на виталност биљака и дају предност биљци у односу на паразита (Konstantinović и сар., 2001). Плодосмена је, такође, неопходан корак у смањењу заразе, али у нашим условима постоји тај проблем што је немогуће искључити из плодосмене све биљке које представљају домаћине проузроковача угљенасте трулежи. Пошто је *Macrophomina phaseolina* паразит којем погодују сушни услови, веома је важно извршити адекватну обраду земљишта која ће омогућити да се у што већој мери очува зимска влага. Самим тим, смањује се негативан утицај стреса на биљке када дођу сушни периоди у току летњег периода вегетације (Balaž и сар., 2010). Биолошки начин је веома интересантан и одржив начин заштите усева. Подразумева уношење нових и већих популација микроорганизама антагониста у земљишта у којима је њихова бројност мала, међу којима је један од најважнијих антагониста гљива *Trichoderma harzianum*. Такође, један од видова превентивне заштите јесте додавање компоста у земљиште који служи као храна за микроорганизме и при томе стимулише њихов раст повећавајући њихову инхибиторну активност (Babović, 2003).

2.5. БИОПЕСТИЦИДИ

Од 2008. године број активних супстанци које се налазе на тржишту је у Европској унији умањен за половину, јер су показале неповољна еколошка и токсиколошка својства. Са трендом смањења броја активних супстанци се наставља, те ће још око 30% бити укинута. С обзиром на то да фунгициди чине 60% онкогеног ризика, у поређењу са осталим пољопривредним препаратима, тежи се ка развоју алтернативних, непестицидних мера у сузбијању биљних патогена (Mihajlović и сар., 2016).

Последњих година све више расте интересовање за биолошке начине заштите усева од болести, штеточина и корова. Тежи се ка томе да се примена ових једињења не ограничава само на органску пољопривреду, него да се прошири и да се ова једињења уведу у примену у интегралној и конвенционалној пољопривреди (Вуковић, Шуњака, 2020).

Земљиште, а нарочито ризосфера биљака, обилују присуством микроорганизама који својим разним активностима потпомажу раст и развој биљака, а такође и учествују у одбрани биљака од штетних микроорганизама. Органску материју земљишта заједно сачињавају бактерије, гљиве, актиномицете и алге. Природни процеси сами својим примерима дају идеју о томе како би човек и на који начин, уз мало труда, могао да потпомогне и природи и себи у пољопривредној производњи. Научним истраживањима и селекцијом микроорганизама који показују изразито повољан утицај на биљке, он позитивно утиче на раст и развој биљака, као и њихову заштиту од штетних чинилаца. Микробиолошки препарати су настали као резултат селекције и они, као активну компоненту, садрже ефективне сојеве једног или више врста микроорганизама и имају за циљ позитиван утицај на раст, принос и здравље биљака (Најнал Јафари и сар., 2020).

Биопестициди су препарати са ефективним сојевима микроорганизама, односно то су производи на бази живих организама или производа који су синтетисани од стране живих организама, који се користе у борби против фитопатогених микроорганизама. У зависности од циљне групе која се сузбија, они се деле на биофунгициде, биоинсектициде, биохербициде и бионематоциде. Њихова примена је све учесталија и у многим случајевима чине алтернативу агрохемикалијама. Ипак, још увек су ретке ситуације у

којима у потпуности могу да замене минерална ђубрива и пестициде (Вуковић, Шуњка, 2020; Најнал Јафари и сар., 2020).

Према подацима Михајловић и сар. (2016) у свету је до 2016. године било регистровано 185 биопрепарата, од којих су 72 биопрепарата на бази бактерија, 47 на бази гљива, 40 као активну материју садрже ентомопатогене нематодe, 24 на бази вируса и 2 су на бази протозоа.

Предности биопрепарата огледају се у следећем:

- ⇒ природног су порекла;
- ⇒ токсичност испољавају само према циљаном организму, што значи да нису токсични нити штетни по здравље људи, животиња и других организама;
- ⇒ испољавају високу ефикасност према циљаном организму;
- ⇒ довољно их је применити у малим количинама како би испољили ефекат;
- ⇒ разграђују се брзо, а штетан утицај по животну средину је мали или га уопште нема;
- ⇒ немају каренцу, као ни радну каренцу, те могу да се примењују непосредно пре жетве или убирања плодова;
- ⇒ смањује се употреба пестицида;
- ⇒ корисни микроорганизми из биопрепарата често бивају активни и у наредној вегетационој сезони;
- ⇒ испољавају позитиван утицај на аутохтону микробну популацију;
- ⇒ могу да се примењују у разним типовима биљне производње.

Поред свих позитивних страна примене биопрепарата, важно је напоменути да они поседују и одређене недостатке:

- ⇒ време и начин примене су у директној зависности од фазе развоја биљке и појаве патогена;
- ⇒ имају ужи спектар деловања;
- ⇒ дејство на циљани организам је спорије у односу на хемијске препарате;
- ⇒ делују превентивно и захтевају вишекратну примену;

- ⇒ осетљиви су на температурне промене, сушење и УВ зрачење, а такође имају и краћи рок трајања, те су им потребни посебни услови складиштења;
- ⇒ могу да испоље инкомпатибилност приликом примене са другим једињењима;
- ⇒ због високе специфичности према циљаном организму може се рећи да је тржиште за одређени препарат ограничено, па у неким случајевима и веома мало;
- ⇒ процес производње и дистрибуција одређених формулација су сложенији;
- ⇒ цене су често више у односу на конвенционалне препарате, те се теже уводе у примену (Вуковић, Шуњка, 2020; Najnal Jafari и сар., 2020).

Једна од најважнијих чињеница, када су у питању биопестициди, јесте та да поседују механизме деловања на циљне организме који се разликују од механизма деловања конвенционалних препарата за заштиту биља. Самим тим, они су способни да делују на резистентне популације штетних организама и неизоставан су чинилац у припреми антирезистентне стратегије (Вуковић, Шуњка, 2020).

2.5.1. Биофунгициди

Биофунгициди су препарати на бази корисних гљива, бактерија и квасаца, етарских уља и биљних екстраката, који се користе за сузбијање фитопатогених гљива како у органској, тако и у другим видовима биљне производње. Постоји неколико механизма деловања, а то су:

- директна конкуренција (представља насељавање корена домаћина биљке корисним микроорганизмима пре настанка инфекције),
- антибиоза (однос између патогена и биолошког агенса у којем биолошки агенс својим токсинима успорава раст патогена),
- предаторство (однос у којем се корисни микроорганизам храни патогеном),
- паразитизам (однос у којем корисни микроорганизам живи на рачун патогена и користи га као извор нутритивних материја),
- индукована отпорност домаћина (активација одбрамбеног механизма у биљци који је последица инокулације биљке домаћина неким биоконтролним организмом са

циљем активације овог типа отпорности, при чему се принцип одбране огледа у успоравању инфекције). Оно што их све повезује јесте превентивно дејство (Вуковић, Шуњака, 2020; Hajnal Jafari и сар., 2020).

Веома значајне фитопатогене бактерије које представљају активне компоненте биофунгицида су *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Streptomyces griseoviridis*. Механизми њиховог деловања заснивају се на колонизацији корена биљке, конкуренцији са патогеном, као и на антибиози. Ипак, водећу улогу када су у питању биофунгициди, преузима гљива *Trichoderma harzianum*, и то чак око 60% биофунгицида који су доступни на тржишту су управо на бази поменуте гљиве (Hajnal Jafari и сар., 2020). За ову гљиву је доказано да паразитира мицелију *Rhizoctonia* и *Sclerotium*, као и да врши инхибицију раста патогена као што су *Pythium*, *Fusarium*, *Fomes* и многих других. Самим тим долази до редукције болести изазваних од стране ових фитопатогених микроорганизама (Babović, 2003).

2.5.2. *Trichoderma spp.*

Царство: *Fungi*

Раздео: *Ascomycota*

Подраздео: *Pezizomycotina*

Класа: *Sordariomycetes*

Ред: *Hypocreales*

Породица: *Hypocreaceae* (<https://www.uniprot.org/taxonomy/5544>)

Комерцијално доступни сојеви гљива из рода *Trichoderma sp.* се у пољопривредној производњи користе као промотери биљног раста, а такође и као биофунгициди. Осим у пољопривреди, примену налазе и у прехранбеној и текстилној индустрији, као и у медицини. Постоји неколико механизма кроз које се остварује промоција биљног раста, а то су: повећање доступности и уноса хранљивих материја, ендифитна активност, повећање

нивоа отпорности на абиотички стрес, продукција секундарних биомолекула, као и продукција биљних хормона. У најбоље промотере биљног раста спадају следеће врсте: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. longibrachiatum*. На основу бројних истраживања, донет је закључак да се највећи број механизма промоције биљног раста заснива на ендифитном односу између гљиве и биљке. Гљива својим присуством механички штити корен биљке од фитопатогена, а такође долази и до индуковања секундарне отпорности. Корен биљке који је заштићен од стране гљиве прожима већу површину земљишта и самим тим јој је доступна већа количина воде и хранљивих материја. Синтезом секундарних метаболита и биљних хормона гљива подстиче раст и развој биљке домаћина (Најнал Јафари и сар., 2020).

Гљиве из рода *Trichoderma sp.* своје биофунгицидно дејство испољавају кроз конкуренцију, паразитизам и аменсализам, али и кроз индуковање системске отпорности биљака. Карактеристике овог рода које су значајне за конкуренцију су раст у широким распонима рН вредности и температуре, брз раст хифе, висок степен репродукције конидија и хламидоспора, мале потребе за водом и храном. Као такви организми, способни су да освоје више животног простора за себе (Најнал Јафари и сар., 2020).

Гљиве из овог рода имају способност да паразитирају на хифама фитопатогених гљива и овај начин њиховог деловања назива се микопаразитизам. Препознавање се одвија уз помоћ малих молекула, нпр. пептида, које ослобађа патоген услед дејства протеаза излучених од стране *Trichoderma spp.* Везивањем за рецепторе долази до активације транскрипционих фактора који појачавају експресију гена који кодирају ензиме који учествују у биосинтези секундарних метаболита и у лизи ћелијског зида. Физички контакт између предатора и патогена остварује се путем израштаја у виду папила које се налазе на крајевима хифе *Trichoderma*, при чему се гљива предатор храни унутрашњим садржајем фитопатогене гљиве (Слика 2.) (Најнал Јафари и сар., 2020).



Слика 2. Електронски приказ хифе *Trichoderma spp.* омотане око хифе фитопатогене гљиве (Фото: Plant Protection: Trichoderma: The multi useful fungi (allplantprotection.blogspot.com))

Аменсализам је такође једна од стратегија у борби против фитопатогених гљива, при чему корисне гљиве синтетишу и излучују у земљиште веома широк спектар биомолекула, међу којима су: антибиотици (директно спречавају раст гљива), петабиоли, микотоксини, као и једињења из група алкохола, кетона, сесквитерпена (успоравају или у потпуности заустављају раст патогена). Када се говори о индуковању систематске отпорности она се одвија у ризосфери биљака тако што гљиве *Trichoderma spp.* врше активацију експресије гена у биљци. Ти гени су одговорни за синтезу ензима хитиназа, β - глукозидаза, пероксидаза и ензима оксидативног стреса. Активношћу поменутих ензима долази до директног подизања нивоа отпорности биљака (Најнал Јафари и сар., 2020).

Khaledi и Taheri (2016) радили су истраживање у којем су користили 11 изолата *Trichoderma spp.* у сузбијању *M. phaseolina*, при чему су резултати инхибиције варирали од 20,22 до 58,67% у тестовима са две културе микроорганизама. Изолати Т7 и Т14 показали су најбоље резултате у *in vitro* условима, те су они надаље коришћени за инхибицију *M. phaseolina* у *in vivo* условима. Резултати су показали да је интензитет обољења био знатно нижи у условима у којима је било третирано семе, него у онима у којима је била третирања земља, иако у већини случајева земљишни третмани показују виши прираст корена и изданка.

Anis и сар. (2010) су у свом истраживању извршили третирање семена сунцокрета гљивом *M. phaseolina*, а затим и антагонистима *Aspergillus flavus*, *Paecilomyces variotii*, *Trichoderma viride*, *Rhizobium meliloti* и *Bacillus subtilis*. Сви антагонисти су инхибирали раст

фитопатогене гљиве и подстакли раст биљака сунцокрета. *Trichoderma viride* је микопаразитизам и обрастање фитопатогене гљиве изразила након 10 дана.

У *in vitro* условима коришћено је седам врста рода *Trichoderma* за контролу *M. phaseolina* применом технике двоструке културе. Седмог дана након инокулације уочена је највећа инхибиција раста гљиве применом антагониста *T. koningi* и *T. harzianum*. Посматрања су настављена у наредних 14 дана, при чему је инхибиција тест гљиве настављена са максималним порастом до 14,7%. Приликом микроскопске анализе донет је закључак да су примењене антагонистичке гљиве способне да прерасту и разграде мицелију домаћина, потпуно је уништавајући (Gajera и сар., 2012).

Sreedevi и сар. (2011) су истраживали ефекат *Trichoderma spp.* у биоконтроли *M. phaseolina* која изазива трулеж корена кикирикија. Из ризосфере земљишта здравих биљака кикирикија изоловали су пет сојева *Trichoderma spp.* и применили технику двоструких контрола. Максималну антифугалну активност показали су изолати *T. harzianum* (Т3) и *T. viride* (Т1), при чему је изолат Т1 инхибирао раст мицелије у количини од 61,1%, а Т3 64,4%. Метаболити које производе гљиве из рода *Trichoderma spp.* инхибирају раст гљиве *M. phaseolina* у *in vitro* условима и показују фунгицидно дејство. Такође, њихов закључак је и да су биљке које су биле третиране гљивом *Trichoderma* показале значајне резултате у прирасту, без обзира на то да ли су биле заражене фитопатогеном гљивом или не.

У Иранској области Голестан извршени су експерименти утицаја *T. harzianum* на *M. phaseolina* на остацима соје. Узорци сегмената корена који су били колонизовани од стране *M. phaseolina* били су закопани у земљишту на три различите дубине. Након осам месеци извршена је анализа, при чему је установљен благ пад учесталости гљиве са 93,3% на 73,6%. У тим узорцима уочено је писуство *Trichoderma spp.* У другој години, остаци *M. phaseolina* су били закопани, у пољским условима, у стерилном и зараженом земљишту које је третирано инокулумом гљиве *T. harzianum* МКР 1321 у поређењу са нетретираним. Проценат учесталости фитопатогене гљиве, и других штетних гљива које су присутне у земљишту, се временом смањило са 77,5% на 11,2%, при чему је учесталост анагонистичке гљиве порасла за 93,9%. Ово указује на веома значајан ефекат гљива из рода *Trichoderma spp.* које су микопаразити фитопатогених гљива (Taliei и сар. 2013).

Врста *Trichoderma harzianum* испољава веома снажан инхибиторни ефекат на гљиве из родова *Rhizoctonia* и *Pythium*, које представљају веома значајне патогене земљишта на отвореним и у затвореним производним просторима. Када је у питању производња зелене салате у пластенику, ефекат се испољава ка врстама *P. debaryanum* и *R. solani*. Препарат Trifender, који је на бази гљиве *Trichoderma asperellum* се успешно користи у сузбијању *P. aphanidermatum* и *Sclerotinia sclerotiorum*, док је слабији ефекат забележен приликом примене за гљиву *Fusarium oxysporum*. У усеву паприке, примењени препарат испољио је ефекат сузбијања проузроковача полегања расада, *Pythium aphanidermatum*, у распону од 3,30 до 16,7% (Михајловић и сар., 2016).

Trichoderma harzianum Т35 успешно контролише фитопатогену гљиву *Fusarium oxysporum*. Осим што се такмиче у колонизацији ризосфере, такмиче се и за хранљиве материје, те што се концентрација хранљивих састојака смањује, ефекат биоконтроле је све јачи. Велики проблем представља гљива *Botrytis cinerea* због поседовања великог броја сојева који лако стварају резистентност на синтетичке фунгициде. Овај проблем је решив уз помоћ примене *T. harzianum* због истовременог испољавања неколико различитих механизма борбе против патогена, те је онемогућен наступ нових сојева патогене гљиве (Benitez и сар., 2004).

2.5.3. *Bacillus* spp.

Бактерије из рода *Bacillus* представљају најраспрострањенији род бактерија у ризосфери земљишта, међу којима су најзначајније врсте *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus firmus*. Своје дејство испољавају кроз синтезу секундарних метаболита, као и биљних хормона као што су цитокинини, гиберелини и индол-сирћетна киселина. Разлагањем органских и неорганских једињења фосфора, калијума и цинка повећавају доступност ових елемената биљкама. Уношењем ових бактерија у земљиште остварују се већи приноси и бољи квалитет различитих биљних врста, међу којима су сирак, кукуруз, пиринач, паприка, лук, малина, парадајз, пшеница, шећерна репа, јечам и многе друге биљне врсте (Најнал Јафари и сар., 2020).

Механизми деловања бактерија из овог рода могу бити директно сузбијање патогена и индуковање системске отпорности биљака. Сузбијање патогена врше продукцијом секундарних метаболита, затим липопептида, антибиотика и разних хидролитичких ензима који врше разградњу ћелијског зида фитопатогена. Такође, имају и способност да неутралишу разорно деловање целулаза и протеаза на биљку продукцијом екстрацелуларних ензима. Своје дејство испољавају и у виду конкуренције, јер брзо могу да колонизују ризосферу. На овај начин се успешно боре против гљива из рода *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, али и са другим фитопатогеним гљивама и бактеријама. Препарати на бази бактерије *Bacillus subtilis* су се показали као веома погодни и значајни у производним условима, а бактерије су способне да преживе током целе вегетације (Најнал Јафари и сар., 2020).

3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Синтетички фунгициди за сузбијање *M. phaseolina* у усеву шећерне репе нису регистровани у Републици Србији. Њихова својства нису екотоксиколошки оправдана, а с обзиром на то да не постоје комерцијални толерантни генотипови шећерне репе, једно од решења јесте проналажење биолошких мера заштите које ће се успешно користити у борби против овог патогена. Врсте гљива из рода *Trichoderma* исказале су значајан потенцијал као биолошки агенси у борби против *M. phaseolina*.

У огледу ће бити коришћена 2 изолата фитопатогене гљиве *Macrophomina phaseolina* која су доказано високе патогености. Као антагонисти биће коришћена два изолата гљиве *Trichoderma harzianum* која су показала висок антагонизам према наведеном патогену у *in vitro* огледима. Циљ истраживања је да се испита биолошка ефикасност одабраних изолата *Trichoderma harzianum* и да се установи могућност и успешност примене у заштити шећерне репе.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Експериментални део истраживања обављен је на Пољопривредном факултету у Новом Саду, Департману за фитомедицину и заштиту животне средине (Слика 3.).



Слика 3. Пољопривредни факултет у Новом Саду (Фото: www.rtv.rs)

4.1. САДЊА И ГАЈЕЊЕ БИЉАКА ШЕЋЕРНЕ РЕПЕ

Биљке шећерне репе су узгајане у „Grow“ расаду, у Иригу, на стерилном супстрату. Услови узгајања су били оптимални, као и хранљивост, за потребе овог истраживања. У тренутку инокулације биљке су биле старости 4 недеље, односно у фенофази 3-4 права листа.

4.2. ПРИПРЕМА ИНОКУЛУМА

Припрема инокулума извршена је инокулацијом семена сирка испитиваним изолатима *Macrophomina phaseolina*, по методи Omar и сар. (2007).

За носач инокулума равномерно је распоређено 3 кг семена сирка у 15 тегли, при чему је свака тегла била напуњена до 1/3 или са по 200 г. Након тога, додато је по 160 мл дестиловане воде, односно на сваких 50 г семена додато је 40 мл воде. Садржај у теглама је промешан и остављен да одстоји 24 часа. Када су прошла 24 часа, семе сирка је поново било промешано и затим аутоклавирано на 120 °C у трајању од 20 - 30 минута. Након што се сирак у потпуности охладио извршена је инокулација тако што су на површину семена били постављени фрагменти подлоге са мицелијом која је стара 5 дана. Семе је инкубирано у термостату на 28° C у трајању од 3 недеље.

4.3. ПРИПРЕМА БИОАГЕНСА

Приликом припреме биолошког агенса коришћено је семе сирка које је инокулисано испитиваним изолатима *Trichoderma harzianum* (T2 и T12), по модификованој методи Khaledi и Taheri (2016).

Укупно 2,5 кг семена сирка је распоређено у 12 тегли које су до 1/3 напуњене семеном, односно у сваку је сипано око 200 г. Тегле су затим напуњене са по 160 мл дестиловане воде, садржај је промешан и остављен да одстоји 24 часа. Након тога, семе сирка је поново промешано и аутоклавирано на 120° C у трајању од 20 – 30 минута. Након потпуног хлађења извршена је инокулација постављањем фрагмената подлоге 7 дана старе мицелије изолата *Trichoderma harzianum* на површину семена.

Семе је инкубирано у термостату на температури од 28° C у трајању од 3 недеље. Након обилне спорулације од стране гљиве, приступило се испирању спора тако што је у сваку теглу сипано по 100 мл стерилног 0,5% раствора Tween – 80. Све тегле су биле добро затворене и садржај у њима се добро промешао, све док семе са гљивом није постало растресито у раствору. Целокупан садржај из тегли је испран преко стерилне газе и левка

и сипан у колбе од 1000 мл (Слика 4.). Након тога је уз помоћ хемоцитометра одређен број спора у раствору.



Слика 4. Припрема биоагенса (Фото: Ориг.)

4.4. ДИЗАЈН ОГЛЕДА

У огледу је испитано укупно 15 варијанти и то:

1. **(К-)** Нетретирана контрола (биљке узгајане у супстрату без инокулума и биолошког агенса)
2. **(К+)** Инокулација изолатом žg23/11 (позитивна контрола)

3. **(Третман 1)** Инокулација изолатом šr23/11 + третман изолатом *T. harzianum* T2
4. **(Третман 2)** Инокулација изолатом šr23/11 + третман изолатом *T. harzianum* T12
5. **(Третман 3)** Инокулација изолатом šr23/11 + третман изолатима *T. harzianum* T2 и T12
6. **(Третман 4)** Инокулација изолатом šr23/11 + третман комерцијалним препаратом на бази *Trichoderma asperellum* (Trifender)
7. **(Третман 5)** Инокулација изолатом šr23/11 + третман комерцијалним препаратом на бази *Bacillus subtilis* (Bacillomix).
8. **(Третман 6)** Инокулација изолатом šr23/11 + третман комерцијалним препаратом на бази активне супстанце тиофанат метил.
9. **(K++)** Инокулација изолатом šr55(3)/09 (позитивна контрола)
10. **(Третман 7)** Инокулација изолатом šr55(3)/09 + третман изолатом *T. harzianum* T2
11. **(Третман 8)** Инокулација изолатом šr55(3)/09 + третман изолатом *T. harzianum* T12
12. **(Третман 9)** Инокулација изолатом šr55(3)/09 + третман изолатима *T. harzianum* T2 и T12
13. **(Третман 10)** Инокулација изолатом šr55(3)/09 + третман комерцијалним препаратом на бази *Trichoderma asperellum* (Trifender)
14. **(Третман 11)** Инокулација изолатом šr55(3)/09 + третман комерцијалним препаратом на бази *Bacillus subtilis* (Bacillomix).
15. **(Третман 12)** Инокулација изолатом šr55(3)/09 + третман комерцијалним препаратом на бази активне супстанце тиофанат метил.

Свака варијанта састојала се из 4 саксије са 16 биљака (свака саксија са по 4 биљке). Инокулум који је произведен на семену сирка помешан је са стерилним песком у односу 3:1 и то у посебним пластичним кутијама, како не би дошло до мешања изолата. Као негативна контрола коришћене су биљке које су узгајане у стерилном песку. Одмах након инокулације биљке су заливане испитиваним препаратима у количини од 100 мл суспензије, а након тога су постављене у термостат и држане у контролисаним условима на 30° C, са сменом светле (18 ч.) и тамне фазе (6 ч.). Биљке које су служиле као позитивна (K+ и K++) и негативна контрола (K-) заливане су са по 100 мл воде.

Биљке су свакодневно обилажене и заливане сходно потребама, при чему се уједно пратио и развој симптома.

4.5. ОЦЕНА СИМПТОМА ОБОЉЕЊА

Након недељу дана симптоми угљенасте трулежи коју проузрокује *Macrophomina phaseolina* су се испољили на 50% биљака из позитивне контроле (K⁺ и K⁺⁺), те је извршено њихово вађење и оцењивање. За оцену интензитета појаве трулежи на младим биљкама шећерне репе коришћена је скала описана у Stojšin и сар., 2012. (Слика 5. и Табела 2.).



Слика 5. Оцене симптома од 0 (крајње лево) до 4 (крајње десно), коришћене за процену интензитета напада од стране *Macrophomina phaseolina* на младим биљкама шећерне репе (Фото: Ориг.)

Табела 2. Скала оцене напада *Macrophomina phaseolina* на младим биљкама шећерне репе (Stojšin и сар., 2012.)

Опис симптома	Оцена
Здрава биљка	0
Индивидуалне лезије на хипокотилу и корену	1
Спајање лезија на хипокотилу и корену	2
Делимична некроза хипокотила и корена	3
Потпуна некроза хипокотила и корена	4

4.6. АНАЛИЗА ПОДАТАКА

За обраду експерименталних резултата коришћен је софтверски пакет STATISTICA. Подаци су обрађени путем једнофакторијалне анализе варијансе (АНОВА), док је за тест парова примењен Дункан-ов тест на нивоу значајности од 95%.

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

5.1. ОЦЕНА СИМПТОМА ОБОЉЕЊА

5.1.1. Симптоми болести на биљкама шећерне репе

Симптоми угљенасте трулежи шећерне репе су се испољили на младим инокулисаним биљкама у различитим интензитетима у зависности од изолата патогена, од изолата биоагенса и од примењених препарата. Од симптома испољили су се хлороза листова, увенуће, некроза и пропадање младих биљака шећерне репе. Симптоми на корену и хипокотилу биљака испољавали су се од индивидуалних и спојених лезија, до делимичне и потпуне некрозе. Услед поменутих симптома дошло је до губљења тургора код биљака, до губљења зелене боје, а биљке које су биле јаче заражене су заостале у порасту, док су неке у потпуности иструлиле.

Резултати теста приказани су у наредним табелама: Табела 3 и 4 за изолат *šr23/11*, док су у Табелама 5 и 6 дати резултати за изолат *šr55(3)/09*.

Табела 3. Анализа варијансе за изолат *Macrophomina phaseolina šr23/11*

Уицај ефекта	Анализа варијансе утицаја биоагенса и комерцијалних препарата на појаву угљенасте трулежи корена шећерне репе				
	SS	Степени слободе	MS	F вредност	p вредност
Варијанта	158.5370	7	22.6481	83.134	0.00
Грешка	29.1500	107	0.2724		

У Табели 3. резултати анализе варијансе указују да постоји значајна статистичка разлика између испитиваних варијанти јер је $p < 0,05$.

У табели 4 приказане су оцене интензитета обољења за спроведене третмане биолошке заштите након инокулације изолатом *Macrophomina phaseolina* šr23/11. Код биљака у некинокулисаној контроли (К-) (Слика 6) очекивано није дошло до испољавања симптома обољења, док је у инокулисаној контроли (К+) (Слика 7) забележен највиши интензитет обољења.

Значајно смањење интензитета угљенасте трулежи на младим биљкама шећерне репе инокулисаним изолатом *Macrophomina phaseolina* šr23/11 забележен је код примене суспензије на бази потенцијалног биолошког агенса на бази *T. harzianum*, изолата Т2. Тенденцију значајног смањења интензитета обољења у односу на инокулисану контролу, али са значајно већом појавом угљенасте трулежи у односу на примену *T. harzianum* изолата Т2 имали су третмани са *T. harzianum*, мешавином изолата Т12 и Т2, као и варијанта примене синтетичког фунгицида (тиофанат метил). Остали третмани су се налазили на истом нивоу значајности као и позитивна (инокулисана) контрола.

Табела 4. Оцена реакције биљака шећерне репе инокулисаних изолатом *Macrophomina phaseolina* šr23/11 након спроведених третмана у циљу сузбијања угљенасте трулежи

Варијанта	Оцена	Ранг*
К- (Нетретирана контрола)	0.00	d
Инокулација + третман изолатом Т2	2.00	e
Инокулација + третман изолатом Т12	3.50	a
Инокулација + третман изолатима Т2 и Т12	2.87	c
Инокулација + третман препаратом Trifender	3.87	ab
Третман 5 (Инокулација изолатом + третман препаратом Bacillomix)	3.63	ab
Третман 6 (Инокулација изолатом + третман препаратом на бази а. с. тифанат метил)	3.07	c
К+ (Инокулација изолатом)	4.00	b

*Између вредности обележених различитим словима постоје значајне разлике на нивоу од 95% (према Duncan-овом тесту значајности разлика између парова)

У Табели 5. резултати анализе варијансе указују да постоји значајна статистичка разлика између испитиваних варијанти јер је $p < 0,05$.

Табела 5. Анализа варијансе за изолат *Macrophomina phaseolina* šr55(3)/09

Утицај ефекта	Анализа варијансе утицаја биоагенса и комерцијалних препарата на појаву угљенасте трулежи корена шећерне репе				
	SS	Степени слободе	MS	F вредност	p вредност
Варијанта	81.4877	7	11.6411	27.5065	0.00
Грешка	38.5123	91	0.4232		

Из Табеле 6. се може закључити да су третмани: Третман 9 (Слика 7.), Третман 7 и Третман 8 испољили позитиван ефекат примене биопрепарата у односу на позитивну контролу (K++) (Слика 7.). Остали третмани: Третман 12, Третман 10 и Третман 11 налазе се на истом истом рангу као и K++.

Табела 6. Duncan test за изолат *Macrophomina phaseolina* šr55(3)/09

Варијанта	Оцена	Ранг
K- (Нетретирана контрола)	0.00	d
Инокулација + третман изолатом T2	1.57	c
Инокулација + третман изолатом T12	2.20	b
Инокулација + третман изолатима T2 и T12	1.54	c
Инокулација + третман препаратом Trifender	2.46	ab
Инокулација + третман препаратом Bacillomix	3.00	a
Инокулација + третман препаратом на бази а. с. тиофанат метил	2.44	ab
K++ (Инокулација)	3.00	a



Слика 6. Негативна контрола К- (Фото: Ориг.)



Слика 7. Упоредивање позитивних третмана са третманима који су имали најбољу оцену. К+ (горе лево), Третман 1 (горе десно), К++ (доле лево), Третман 9 (доле десно) (Фото: Ориг.)

У овом истраживању најбољи резултати добијени су приликом примене изолата *T. harzianum* T2. У истраживању спроведеном од стране Khalili и сар. (2016) у борби против *M. phaseolina* коришћена су три изолата *Trichoderma harzianum* (изолати под шифрама T2, T10 и T12). Изолат T12 показао је знатно већи инхибиторни ефекат у односу на T2 и T10, при чему је инхибирао раст фитопатогене гљиве у тестовима двоструке културе, затим у тестовима испарљивости, а приликом теста хиперпаразитизма уочено је да су ћелије *M. phaseolina* биле лизирале. Приликом примене изолата T12 у пољским условима, било третирањем земљишта или третирањем семена, уочен је знатно нижи ниво заражавања биљака соје.

Elad и сар. (1986) су својим истраживањем у *in vitro* условима доказали позитиван ефекат четири изолата *T. harzianum* на инхибицију раста и производњу микросклероција гљиве *M. phaseolina*. На пасуљу који је узгајан у стакленичким условима учесталост појаве болести умањена је за чак 37 - 74%, док је на семену диње које је третирано овим биоагенсом учесталост болести умањена за 37,5 – 46,3%. Осим у *in vitro* условима и у пољским условима је учесталост појаве болести смањена је за 22 – 28%, а присуство *T. harzianum* даје и позитивне резултате у ранијем развићу биљке и плодова диње.

Iqbal и Mukhtar (2020) су својим истраживањем потврдили ефекат седам аутохтоних врста *Trichoderma* на гљиву *M. phaseolina* која у Пакистану представља велики проблем за поља на којима се узгаја зелени и црни мунго пасуљ. Све врсте *Trichoderma* показале су значајне резултате у сузбијању ове фитопатогене гљиве. Највиши степен редукције пораста гљиве постигла је врста *T. harzianum* и то чак 79,63%, а такође је ова врста испољила и максималну редукцију величине микросклероција. Највиши степен преживљавања биљака постигнут је тамо где је примењена врста *T. harzianum*, а за њом су значајне резултате дале и *T. hamatum* и *T. viride*. Максимална клијавост биљака постигнута је под утицајем *T. harzianum*. Још један важан закључак који је донет у овом истраживању јесте да је опстанак биљака у директној вези за концентрацијом антагониста, те што је концентрација нижа, проценат опсталих биљака опада и обрнуто.

6. ЗАКЉУЧАК

На основу спроведеног истраживања, могу се донети следећи закључци:

- Резултати биотеста доказују да су све биљке шећерне репе, које су биле изложене дејству фитопатогене гљиве, показале осетљивост према изолатима *Macrophomina phaseolina* šr23/11 и šr55(3)/09.
- Биљке из негативне контроле (К-) су биле потпуно здраве и на корену, хипокотилу и формираној лисној маси нису уочени симптоми обољења.
- Биљке из позитивне контроле за изолат *M. phaseolina* šr23/11 су показале да је овај изолат агресивнији, у односу на šr55(3)/09.
- Најбољи резултати у заштити младих биљака шећерне репе инокулисаних са изолатима *M. phaseolina* šr23/11 и šr55(3)/09 остварени су у присуству изолата *Trichoderma harzianum* T2 као агенса биолошке заштите.
- За изолат *M. phaseolina* šr23/11 најбољи резултат остварен је у Третману 1 (третман изолатом *T. harzianum* T2), а након овог третмана задовољавајуће резултате дали су и Третман 3 (третман изолатима *T. harzianum* T2 и T12) и Третман 6 (третман комерцијалним препаратом на бази активне супстанце тиофанат метил).
- За изолат *M. phaseolina* šr55(3)/09 најбољи резултат остварен је у Третману 9 (третман изолатима *T. harzianum* T2 и T12), при чему су задовољавајући резултати добијени и у Третману 7 (третман изолатом *T. harzianum* T2) и Третману 8 (третман изолатом *T. harzianum* T12).
- Третмани комерцијални биолошким препаратима за заштиту биља, Trifender и Bacillomix, су у овом истраживању показали нижу ефикасност од осталих примењених третмана.

- Ово истраживање има потенцијал да утиче на побољшање заштите шећерне репе од проузроковача угљенасте трулежи корена тако што указује на огроман значај примене биопрепарата на бази гљиве *Trichoderma harzianum*, која је показала веома задовољавајуће резултате у производњи шећерне репе.
- С обзиром на непостојање комерцијално доступних хемијских средстава, у сузбијање овог проузроковача потребно је увести примену биопрепарата на бази гљиве *Trichoderma harzianum*, уз поштовање свих превентивних и агротехничких мера заштите.

Из горе приказаних резултата може се извести следеће:

- на изолат *M. phaseolina* šr23/11 најбољи резултат у биолошкој борби испољио је изолат *T. harzianum* T2 произведен у овом истраживању, као и комбинација изолата *T. harzianum* T2 и T12. Од комерцијалних препарата који су примењени у овом истраживању, позитиван ефекат испољио се приликом примене препарата на бази активне материје тиофанат метил;
- изолат *M. phaseolina* šr55(3)/09 се показао као мање агресиван у односу на изолат *M. phaseolina* šr23/11. Најбољи ефекат на овај изолат испољио је третман у којем је примењена комбинација изолата *T. harzianum* T2 и T12, а такође веома задовољавајући ефекат испољио се и приликом самосталне примене изолата *T. harzianum* T2. Комерцијални препарати нису дали задовољавајуће ефекте.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Anis, M., Abbasi, W., Zaki, M.J. (2010): Bioefficacy of microbial antagonists against *Macrophomina phaseolina* on sunflower. Pak J Bot. 42:2935 - 2940.
2. Babović, M. (2003): Osnovi patologije biljaka, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, str. 54., 596.
3. Balaž, F., Balaž, Jelica, Tošić, M., Stojšin, Vera, Bagi, F. (2010): Fitopatologija, bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad , str. 216 – 218.
4. Bažok, Renata, Barić, Klara, Čačija, Maja, Drmić, Zrinka, Đermić, Edyta, Gotlin Čuljak, Tanja, Grubišić, Dinka, Ivić, D., Kos, T., Kristek, A., Kristek, Suzana, Lemić, Darija, Šćepanović, Maja, Vončina, D. (2015): Šećerna repa - zaštita od štetnih organizama u sustavu integrirane biljne proizvodnje, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, ISBN 978-953-7878-44-3
5. Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Condon, A.C. (2004): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7 (4): 251.
6. Вуковић, Славица, Шуњка, Драгана (2020): Корови и биопестициди (део БИОПЕСТИЦИДИ) – практикум, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад, стр. 3., 7.
7. Gajera, H.P., Bambharolia, R.P., Patel, S.V., Khatrani, T.J., Goalkiya, B.A. (2012): Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: Evaluation of Coiling and Cell Wall Degrading Enzymatic Activities. J Plant Pathol Microb 3:149. DOI:10.4172/2157-7471.1000149

8. Elad, Y., Zvieli, Y., Chet, I (1986): Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum*, Crop Protection, Volume 5, Issue 4, Pages 288-292
9. Iqbal, U., Mukhtar, T. (2020): Evaluation of Biocontrol Potential of Seven Indigenous *Trichoderma* Species against Charcoal Rot Causing Fungus, *Macrophomina phaseolina*, *Gesunde Pflanzen* 72, 195–202 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00501-x>
10. Khaledi, N., Taheri, Parissa (2016): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*, Journal Of Plant Protection Research. Vol. 56, No. 1, стр. 22 - 31.
11. Khalili, E., Arshad Javed, M., Huyop, F., Rayatpanah, S., Jamshidi, S., Abdul Wahab, R. (2016): Evaluation of *Trichoderma isolates* as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 30:3, стр. 479 – 488., DOI:10.1080/13102818.2016.1147334
12. Konstantinović, B., Štrbac, P., Balaž, F. (2001): Zaštita šećerne repe od štetočina, bolesti i korova, "STYLOS" doo, Novi Sad, str. 71 – 72.
13. Marinković, B., Crnobarac, J. (2000): Zavisnost kvaliteta i prinosa šećerne repe od primene NPK hraniva, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, br. 31, str. 345-350
14. Marković, T., Zekić, V. (2011): Ekonomske karakteristike proizvodnje šećerne repe, Agroekonomija, Ratar. Povrt. 48., 423-428
15. Mihajlović, Milica, Rekanović, E., Hrustić, Jovana, Grahovac, Mila, Tanović, Brankica (2016): Mogućnost biološkog suzbijanja patogena iz zemljišta, Biljni lekar, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, godina 44, broj 3, ISSN 0354-6160*UDK 632, str. 231 – 234.
16. Omar, M.R., Abd-Elsalam, K.A., Aly1, A.A., El-Samawaty, A.M.A., Verreet, J.A. (2007): Diversity of *Macrophomina phaseolina* from cotton in Egypt: Analysis of pathogenicity, chlorate phenotypes, and molecular characterization Journal of Plant Diseases and Protection, 114 (5): 196–204.

17. Sreedevi, B., Charitha Devi, M., Saigopal, D.V.R. (2011): Isolation and screening of effective *Trichoderma* spp. against the root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Technology, 7(3): 623-635.
18. Stojšin, Vera, Ferenc, B., Ferenc, B. (2008): Praktikum iz fitopatologije - Mikoze i pseudomikoze ratarskih i povrtarskih biljaka, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, str. 198., 240.
19. Taliei, T., Safaei, N., Aghajani, M.A. (2013): Survival of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on soybean residuals and the effect of *Trichoderma harzianum* on their population dynamics. Journal of Applied Researches in Plant Protection 1: 1–13.
20. Todorović, J., Komljenović, I. (2003): Posebno ratarstvo, Grafomark Laktaši, Banja Luka, str. 268 – 271., 294-295.
21. Hajnal Jafari, Timea, Stamenov, Dragana, Đurić, Simonida (2020): Proizvodnja i primena biopreparata, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, str. 1., 9 - 11., 42-43., 70., 72., 89., 91-92., 97 – 99.
22. https://bonapeti.rs/n7-84971-%C5%A0e%C4%87erna_Repa (28.7.2021.)
23. <https://data.stat.gov.rs/Home/Result/130102?languageCode=sr-Cyrl#> (28.7.2021.)
24. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/32134> (29.6.2021.)
25. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (28.7.2021.)
26. <https://www.uniprot.org/taxonomy/5544> (22.6.2021.)